

Санкт-Петербургский государственный университет

Рубанова Ирина Андреевна

Анализ процессов раннего развития *Dinophilus gyrociliatus* (Dinophilidae: Polychaeta)

Выпускная квалификационная работа по основной образовательной программе
бакалавриата «Биология»

Работа выполнена на кафедре эмбриологии СПбГУ
(И.о. зав. кафедрой – к.б.н., доцент Р.П. Костюченко)

Научный руководитель:
доцент кафедры эмбриологии,
к.б.н., доцент Р.П. Костюченко

Санкт-Петербург

2019

Оглавление

Введение.....	3
Обзор литературы.....	4
Филогения Dinophilidae и архианнелиды.....	4
Оогенез и определение пола <i>Dinophilus gyrociliatus</i>	5
Эмбриональное развитие <i>Dinophilus gyrociliatus</i>	7
Метамерия и гетерономность.....	9
Материалы и методы.....	11
Прижизненное наблюдение.....	11
Изготовление полутонких срезов.....	11
Окрашивание полутонких срезов.....	12
Визуализация и анализ материала.....	12
Результаты.....	13
Оогенез.....	13
Раннее развитие.....	17
Обсуждение.....	24
Формирование оболочки кокона.....	24
Оплодотворение.....	24
Кортикальная реакция и ооплазматическая сегрегация.....	25
Первые деления.....	26
Список литературы.....	29

Введение

Dinophilidae (Polychaeta) – семейство итерстициальных многощетинковых червей.

Несмотря на то, что *Dinophilus* был описан во второй половине 19 века (Schmidt, 1848), это семейство до сих пор остается мало изученным. Эта группа червей представляет большой интерес, так как представители этого семейства сочетают в себе морфологические признаки различных Lophotrochozoa таких как Polychaeta, Mollusca, плоские черви. Взрослая особь *Dinophilus* напоминает личинку аннелид – трохофору (Struck, 2006).

Большая часть исследований по морфологии, гистологии, и развитию динофилид были выполнены в 19-20 веках (Schimkewitsch, 1895; Nelson, 1904; Nachtsheim, 1919; Grün, 1972). И хотя эмбриональное развитие было подробно описано Нельсоном (Nelson, 1904), эта работа пока остается единственной подобного рода. И многие аспекты раннего развития остаются до сих пор не освещенными в литературе.

В последнее время интерес к динофилюсу снова возрос (Andrade *et al.*, 2015; Kerbl *et al.*, 2016; Müller and Westheide, 2002; Kerbl *et al.*, 2017). Исследователями вновь поднимаются вопросы о происхождении вида как эволюционно продвинутого или исходно примитивного (Giangrande and Gambi, 1998). До сих пор нет четкого представления о систематическом положении динофилид (Andrade *et al.*, 2015).

Цель:

дать характеристику некоторым процессам раннего развития у *Dinophilus gyrociliatus*.

Задачи:

1. Выявить в процессе оогенеза особенности формирования оболочки кокона.
2. Определить момент оплодотворения.
3. Проанализировать на предмет наличия или отсутствия таких явлений, как кортикальная реакция и ооплазматическая сегрегация.
4. Дать характеристику и установить хронологию первых делений дробления.

Обзор литературы

Филогения *Dinophilidae* и архианнелиды

Систематическое положение динофилид давно волнует исследователей. С момента описания вида, их относили к разным группам: немертинам (Agassiz, 1867), турбелляриям (Weldon, 1886), кто-то полагал, что динофилиды занимают промежуточное положение между аннелидами и коловратками (Schimkewitsch, 1895). Такое противоречие объясняется тем, что взрослое животное включает в себя признаки перечисленных групп. Первым, кто поместил динофилюса среди аннелид, был Schmarda (Schmarda, 1861). Взрослая особь дин напоминает личинку аннелид – трохофору. Мечников отмечал этот факт, и предложил неотению у динофилид (Mecnikow, 1866). Беклемишев называл динофилюса «неотенической трохофорой» (Беклемишев, 1964).

Изначально концепция группы Archiannelida предполагала, что входящие в нее таксоны демонстрируют предковое состояние аннелид (Hermans, 1969). Хотя называть архианнелид либо вторично редуцированными, либо примитивно простыми, предполагало бы, что происхождение этих кольчатых червей известно. Поэтому было бы лучше называть архианнелид группой полихет, в первую очередь приспособленных к интерстициальной среде обитания. Поэтому можно предложить другой способ возникновения такой организации – прогенез (Westheide, 1987). То есть, у личиночных или ювенильных стадий более крупного предка происходит арест соматического развития, и они достигали половой зрелости. Следовательно прогенетические виды должны напоминать ювенильные или личиночные стадии предков. В наше время группы Archiannelida не существует, и если говорят об архианнелидах, то скорее как о полифилетической группе полихет приспособленных к интерстициальному образу жизни (Westheide, 1985).

Морфологические исследования нервной и мышечной систем (Kerbl *et al.*, 2016) подтверждают прогенетическую концепцию происхождения вида, но молекулярные данные не могут дать четкого ответа. Согласно последним филогенетическим исследованиям представители «архианнелид» занимают далеко не базальное положение, а простой план строения не является предковой чертой аннелид. Предлагается что семейство *Dinophilidae* входит в состав клады *Orbiniida* (с низкой поддержкой) вместе с семейством макрофауны *Orbiniidae*, а также с мейофауны *Nerillidae*, *Parergodrilidae*, *Diurodrilidae* и *Apharyngtus* (Struck *et al.*, 2015). Тем не менее, еще одно исследование

посчитало эту позицию достаточно обоснованной (Andrade *et al.*, 2015), и ни одно из исследований не могло определить ближайшего родственника динофилид.

Оогенез и определение пола *Dinophilus gyrociliatus*

Представителей рода *Dinophilus* можно разбить на две группы, отличающиеся друг от друга наличием или отсутствием диморфизма взрослых особей и яиц (Jägersten, 1951; Prevedelli and Simonini, 2003; Kerbl *et al.*, 2016). Для группы видов с диморфизмом характерен не только диморфизм взрослых особей, но и диморфизм яиц. У мономорфных динофилюсов не различаются по внешнему виду как взрослые самцы и самки, так и мужские и женские яйца.

Dinophilus gyrociliatus – вид с явно выраженным половым диморфизмом. Самцы карликовые, доходят в размере до 50 микрометров, с явными признаками деградации (у них нет глаз, пищеварительной системы). Самки достигают 1 мм. Половозрелые самки откладывают коконы с двумя типами яиц: крупные, из которых впоследствии развиваются самки, и мелкие из которых развиваются самцы. Еще в коконе самец гистолитически разрушает интегумент и вводит сперму своим незрелым сестрам. После копуляции самец выходит из кокона и умирает (Traut, 1969a; Fofanova, Nezlin and Voronezhskaya, 2014).

Многие исследователи рассматривали вопросы оогенеза и определения пола у динофилюса (Shearer, 1911; Tzonis, 1938; Traut, 1969a, 1969b, 1970; Grün, 1972). Не смотря на то что, никто не описывал процесс и момент оплодотворения, в литературе превалирует мнение что оплодотворение у динофилюса внутреннее (Traut, 1970; Grün, 1972).

По данным Грюна (Grün, 1972) гонады у динофилюса представлены непарным яичником на правой стороне тела. На верхушке гонады располагается скопление оогоний. Это некрупные клетки с большим ядром и малым объемом цитоплазмы. К оогониям прилегают ооциты, которые поначалу не сильно отличаются от самих оогоний, но дальше их объем увеличивается. Эти ооциты сливаются. В результате образуются крупные клетки с несколькими ядрами. В дальнейшем эти ядра сливаются, или дегенерируют. К концу фазы превителлогенеза разница между ооцитами в отношении их дальнейшей судьбы не наблюдается. В процессе вителлогенеза ооциты значительно увеличиваются в размерах, начинается синтез гранул желтка, и появляются различия между ооцитами. В ♂-ооцитах доля гранул желтка больше чем в ♀-ооцитах, хотя сами гранулы по размеру меньше. Также синтез мукополисахаридных гранул начинается в ♂-ооцитах раньше чем в ♀-ооцитах. Эти гранулы по мере созревания ооцита мигрируют на периферию ооцита, чтобы

в процессе откладки из их содержимого были построены оболочки яйца и кокона. Поэтому эти гранулы могут служить индикатором зрелости ооцита. Эти мукополисахаридные гранулы не принимают участие в процессе кортикальной реакции при оплодотворении, так как оплодотворение происходит на этапах вителлогенеза. Сигналом к выбросу содержимого является контакт с морской водой (Traut, 1970; Grün, 1972).

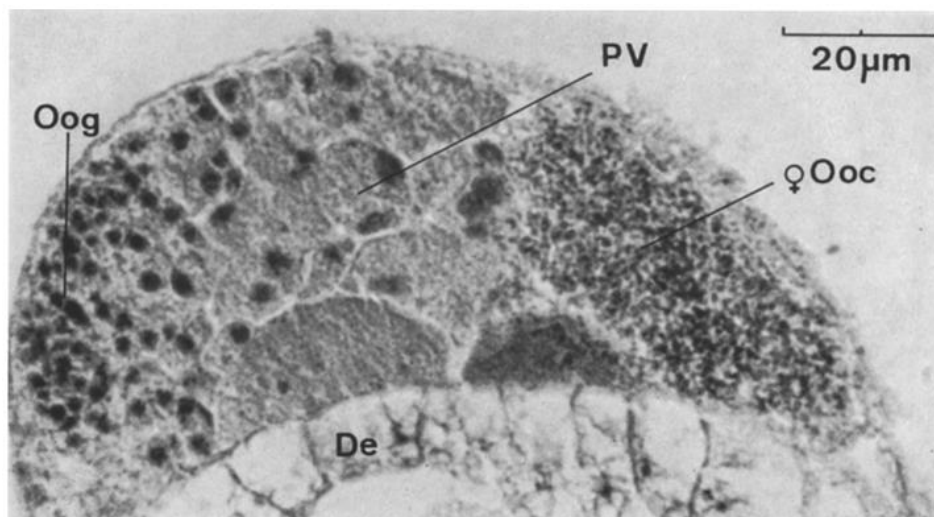


Рисунок 1. Срез через яичник *Dinophilus gyrociliatus* с ооцитами на разных стадиях оогенеза (Grün, 1972).

Определение пола и образование двух типов яиц у *Dinophilus gyrociliatus* не связаны и происходят не в одно время (Martin and Traut, 1987). В метафазе I в сперматоцитах у 4-5 дневных зародышей самцов обнаруживается унивалент, который лежит вне метафазной пластинки на полюсе одного из веретен деления (Рис. 2). В метафазных пластинках ооцитов все хромосомы вовлечены в метафазные пластинки и подобного унивалента обнаружено не было. На основе цитологических исследований было показано, что появление двух типов яиц не зависит от осеменения и оплодотворения (Nachtsheim, 1919). Наличие унивалента в сперматоцитах и его отсутствие в ооцитах говорит о нем как о половой хромосоме, типичной для XX – XO системы. Образование двух типов яиц происходит до оплодотворения (Traut, 1969a). То есть, у динофилюса образование ♀ и ♂ типов яиц прогамное и не зависит от оплодотворения, а определяется генетическими и экологическими факторами. А определение пола сингамное и зависит от избирательного оплодотворения ♀- яиц X-сперматозоидом, а ♂- яиц O-сперматозоидом (Martin and Traut, 1987).

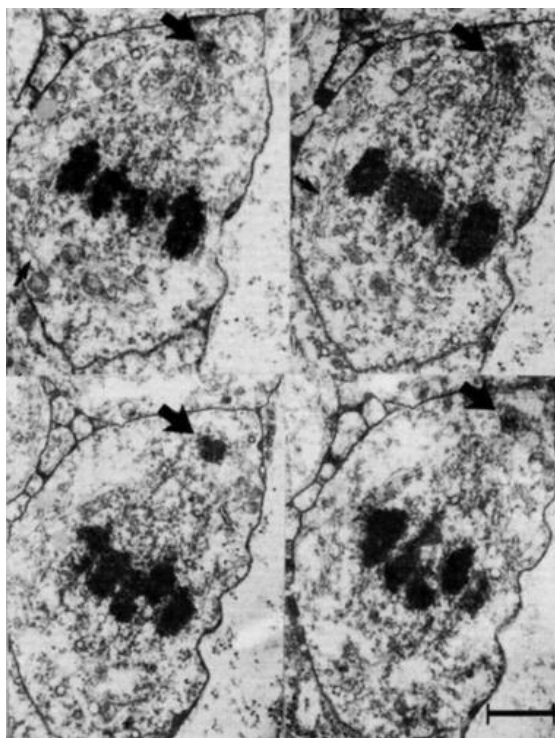


Рисунок 2. Серийные ультратонкие срезы через метафазу I в сперматоцитах зародышей самцов *Dinophilus gyrociliatus*. Стрелкой отмечен половой унивaлент, который лежит за пределами метафазной пластики (Martin and Traut, 1987).

В исследовании кариотипа динофилюса (Simonini *et al.*, 2003) был установлен диплоидный набор хромосом, и были показаны различия между ♀ и ♂ кариотипами. ♀ кариотип $2n=24$. ♂ кариотип $2n=23$. Половые X-хромосомы крупнее аутосом. Хромосомы динофилюса меньше чем хромосомы других полихет (Sato and Ikeda, 1992; Sella *et al.*, 1995; Dixon, Pascoe and Dixon, 1998). А их количество больше по сравнению с другими интерстициальными полихетами ($2n=6-18$), у которых диплоидный набор меньше чем у макробентосных полихет ($2n=18-72$) (Gambi *et al.*, 1997). Это исследование подтверждает гетерогаметность самцов по типу XX –ХО и сингамное определение пола у *Dinophilus gyrociliatus*.

Эмбриональное развитие *Dinophilus gyrociliatus*

Эмбриональное развитие динофилид изучено плохо. В единственной статье Нельсона (Nelson, 1904) описывается дробление *Dinophilus apatris* с применением буквенно – цифровой номенклатуры для обозначения бластомеров, предложенной Эдвином Конклиным (Conklin, 1897) и модифицированной Чайлдом (Child, 1900). В результате первых взаимно перпендикулярных меридиональных делений образуются первые четыре бластомера А, В, С и D, которые будут давать начало квадрантам. Каждый из четырёх макромеров в последующих циклах дробления отделяет к анимальному полюсу

относительно небольшую дочернюю клетку – микромер. Веретёна делений дробления при этом имеют наклон около 30° относительно анимально-вегетативной оси. В результате микромеры смещаются относительно макромеров. При дексиотропном делении смещение происходит по часовой стрелке, при леотропном – против часовой стрелки. В ходе последующих делений происходит чередование дексиотропных и леотропных делений. Макромеры обозначаются индексами 1A, 1B, 1C и 1D. Микромеры – 1a, 1b, 1c, 1d. Цифра указывает на номер квартета. Буква обозначает принадлежность к квадранту. После четвертого деления дробления образуется новый квартет микромеров 2a – 2d, и макромеров 2A – 2D. Как правило образуется четыре квартета микромеров. Потомки микромеров сохраняют обозначение исходного микромера и дополняются числовым индексом, одним – после первого деления, двумя – после второго. Дочерняя клетка, которая направлена к анимальному полюсу получает индекс 1, к вегетативному – 2. Например из 2a получаются $2a^1$ и $2a^2$. Из $2a^1$ образуются $2a^{11}$ и $2a^{12}$. На сегодняшний день *Dinophilus apatris* (Korschelt, 1882) принимается (Fauvel, 1927) за *Dinophilus gyrotilatus* (Schmidt, 1857).

Макромеры делятся не одновременно, а последовательно в строгом порядке D, C, A, B. Этот порядок сохраняется на протяжении пяти последующих делений, и более менее сохраняется у потомков макромеров. Такой порядок делений коррелирует с различиями в размерах между макромерами (Nelson, 1904).

Уже на стадии 29 клеток выявление зародышевых листков. Первый (12 клеток), второй (8 клеток), третий (4 клеток) квартеты – эктобласт. 4d – мезобласт. Энтомеры (4 клетки) – энтобласт. То есть, выделение листков проходит параллельно с делением 3D на 4D и 4d и делением 2B на 3B 3b (Nelson, 1904).

Гастрюляция идет по типу эпиболлии. Группа эктодермальных клеток на крыше бластоцели растягиваются и сплющиваются, постепенно уменьшая ее просвет и в конечном итоге полностью закрывая ее. Это уплощение шапки эктодермальных клеток значительно меняет форму зародыша. Из сферического, контур становится вытянутым под прямым углом вдоль оси яйца. Эктодерма перемещается по энтодерме вперед, закрывается бластопор. Теперь первый квартет лежит к переднему полюсу зародыша. Та часть эктодермы, которая ранее обозначала анимальный полюс животного, апикальную розетку или ее производные, теперь просто лежит дорсальнее переднего полюса зародыша, в то время как граница первого квартета лежит в плоскости почти под прямым углом к длинной оси зародыша. Это поступательное движение эктодермы вызвано митотической

активностью 2d бластомера. По мере смыкания бластопора вегетативные полюса энтомеров становятся меньше и уже, а анимальные – больше и шире (Nelson, 1904).

Нельсон подробно проследил судьбу клеток первого квартета. И, несмотря на отличия от других видов полихет в формировании прототроха, автор пришел к выводу, что вторая преоральная ресничная полоса у динофилюса гомологична прототроху трохофор аннелид (Nelson, 1904).

Нельсон (Nelson, 1904) называл гипотезу Мечникова «почти пророческой» и не рассматривал развитие динофилюса как примитивное. Эту точку зрения подтверждают многочисленные отклонения от спирального типа дробления, представленными делениями первичных трохобластов и многих других клеток, а также несоответствием размера 2b и 3b по сравнению с их сестринскими клетками. Также огромные размеры 2d и 4d, которые приобрели очень большое количество цитоплазмы для снабжения материала для создания заднего конца тела, который у трохофоры обычно формируется за счёт зоны роста, могут служить доказательствами вторичных изменений. Помимо этого существует замедленное развитие взрослых органов, которые не становятся функциональными, пока животное почти не готово к выходу из кокона, но которые должны были быть функциональными в гораздо более ранний период. Такими органами являются кишечник и прототрох. Таким образом, Нельсон придерживается мнения о том, что динофилюса следует рассматривать как «стационарную личинку аннелид», у которой личиночная стадия стала конечной и модифицированной.

Метамерия и гетерономность

Гетерономность сегментов – форма метамерии тела, при которой разные сегменты различаются по структурным и функциональным особенностям. Согласно теории первичной гетерономности сегментов П. П. Иванова (Ivanov, 1928) следует различать два типа гетерономности сегментов – первичная (с образованием ларвальных сегментов) и вторичная (с развитием сегментов туловища, дифференцированных по регионам, как адаптация к разным образам жизни) . Первичные или ларвальные сегменты отличаются от вторичных (постларвальных) по способу развития и строению. Ларвальные сегменты появляются одновременно, их мезодерма возникает из бластомера 4d, в них нет органов половой системы, и имеются отличия в строении брюшной нервной цепочки и кровеносной системы. Мезодерма ларвальных сегментов сегментирована полностью или частично, но по своему происхождению не метамерна. Постларвальные сегменты

появляются последовательно из зоны роста. Их мезодерма не всегда происходит из 4d. Они содержат нефридии и половые продукты.

Анализируя труд Иванова, Беклемишев (Беклемишев, 1964) предположил, что наличие или отсутствие первичной гетерономии в полихетах может привести к двум различным состояниям: полимерному и олигомерному. Всё тело полимерных аннелид можно подразделить на два отдела: ларвальный и постларвальный, которые различаются по строению и механизмам формирования. Олигомерные аннелиды состоят только из ларвальных сегментов. Полимерное состояние является общим для разных семейств, некоторые из которых филогенетически не связаны (Nereididae, Polynoidae, Sigalionidae, Phyllodocidae, Tomopteridae, Serpulidae и Eunicidae), и Андерсон (Anderson, 1973) предположил независимое происхождение этой черты. Он полагал, что если первичная гетерономность сегментов – примитивное свойство у полихет, то она должна быть узнаваема в развитии всех полихет. А поскольку у большинства видов с прямым развитием сегменты формируются последовательно до и после метаморфоза, Андерсон утверждал, что первичная гетерономность появилась как вторичная личиночная специализация и сохранилась в определенных семействах.

Типичные представители полимерных полихет, например, *Platynereis* имеют не прямое развитие. Лецитотрофные личинки ведут пелагический образ жизни. После оседания и начала активного кормления начинается формирование постларвальных сегментов из зоны роста на заднем конце тела червя перед пигидием (Balavoine, 2014). Тело динофилюса состоит из ларвальных сегментов. Согласно идеям Иванова (Иванов, 1937), из сходной олигомерной формы могла появиться полимерия путём сегментации. Вопрос, какое состояние, полимерно или олигомерное, является первичным у кольчатых червей, пока остается открытым.

Таким образом, данные полученные исследователями в 19-ом и 20-ом веках требуют расширения представлений о начальных этапах развития *Dinophilus gyrociliatus*. Изучение этих событий представляет особенный интерес ввиду малоизученности этого вопроса и его важности для всего хода дальнейшего развития.

Материалы и методы

В основной культуре взрослых животных *Dinophilus gyrociliatus* содержали в стеклянных кристаллизаторах объемом 1 – 1,5 литра в искусственной морской воде (соленость 30 ‰) при температуре 18 °С. В качестве корма использовали перетертые в ступке с небольшим объемом морской воды листья крапивы. Кормление осуществляли раз в неделю. Смену воды проводили раз в три месяца.

Прижизненное наблюдение

Чтобы измерить интервалы между первыми деления, было проведено прижизненное наблюдение над зародышами. Двух – трех самок отсаживали на предметное стекло в капле морской воды, так чтобы после покрытия покровным стеклом объем капли занимал не более 70-80% площади. Эту каплю заключали в минеральное масло для предотвращения испарения воды. Такие препараты отсматривали в течение дня и проверяли на наличие отложенных коконов. Далее проводили наблюдение над отложенными коконами для изучения морфологии первых делений и определения временных интервалов между ними.

Изготовление полутонких срезов

Для получения зародышей ранних стадий самок отсаживали в чашку Петри и проверяли через 12 часов на предмет отложенных коконов. Отложенные коконы отбирали и фиксировали в 4% формалине на 1,75-кратном трехсолевом фосфатном буфере (PBS) с 0,1% Tween 20 (ph=7.4) в течение ночи при температуре 4°C.

Перед фиксацией самкам проводили анестезию в 7% растворе MgCl₂, смешанном в соотношении 1:1 с искусственной морской водой. Затем расслабленных животных отмывали в морской воде и фиксировали в 4% формалине на 1,75-кратном трехсолевом фосфатном буфере (PBS) с 0,1% Tween 20 (ph=7.4) в течение ночи при температуре 4°C.

На следующий день объекты отмывали от фиксатора в трех сменах буфера. Для лучшей ориентации в смоле объекты были окрашены водным раствором алцианового синего (ph=2.5). Alcian blue (порошок) – 0,125 г, дистиллированная вода – 12,125 мл, ледяная уксусная кислота – 0,375 мл. Перед применением краску фильтровали. Окрашивание проводилось в течение 10 минут с последующими несколькими отмывками дистиллированной водой. Далее объекты проводили через батарею спиртов повышающейся концентрации (30° этанол → 50° этанол → 70° этанол → 80° этанол → 90°

этанол → 96°этанол) по 15 минут в каждом. После второй смены 96°этанола материал переводили в смесь 96°этанола и ацетона в соотношении 1:1 на 30 минут. Далее объекты выдерживали в трех сменах ацетона по 30 минут. После последней смены ацетона объекты помещали в смесь ацетона и смолы в соотношении 1:1 в открытой посуде в тяге на ночь. Смолу изготавливали в день применения. Эпон 812 – 6,25 мг, Аралдит М – 3,75 мг, DDSA – 13,75 мг, DMP-30 – 25 капель. На следующий день объекты переносили в свежую смолу и оставляли на 6 часов для пропитки. Первые 3 часа в открытой посуде, вторые 3 часа в закрытой. Потом объекты переносили в блоки со свежей смолой, и производили ориентацию объектов в блоке. После этого блоки помещались в термостат на 60°C для полимеризации смолы на ночь.

Полутонкие срезы (толщина 500 нанометров) изготавливали на ультратоме Leica EM UC7 в Ресурсном Центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Окрашивание полутонких срезов

Полученные срезы выкладывали на предметные стекла в капле воды. Стекла потом помещали на горячий нагревательный столик для того, чтобы срезы приклеились к стеклу. Окрашивание срезов осуществляли 1% водным раствором метиленового синего на 1% буре. В 100 мл дистиллированной воды растворяли 1 грамм 10-ти водного тетрабората натрия (бура). Далее добавляли 1 грамм порошка метиленово синего. Раствор тщательно перемешивали и перед применением фильтровали. Краску приготавливали заранее. На нагревательном столике при температуре 60°C стекла со срезами согревали и производили окрашивание в течение двух минут. После краску смывали дистиллированной водой, и откладывали препараты сушиться на тот же столик. После полного высыхания, препараты были заключены в смолу.

Визуализация и анализ материала

Материал анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1, оснащенный дифференциальным интерференционным контрастом (DIC), проходящей световой микроскопией, консолью ApoTome, камерой AxioCam ICc3 и программным обеспечением AxioVision 4.8. Морфометрические измерения диаметров зародышей и полярных телец были выполнены с использованием программы AxioVision 4.8. Дальнейший анализ полученных изображений и построение реконструкций были осуществлены с помощью программы Adobe Illustrator. Обработку изображений проводили в программе Adobe Photoshop.

Результаты

Оогенез

Оогенез у *Dinophilus gyrociliatus* локализованный, протекает в течение всей жизни самки в непарном яичнике на правой стороне тела. Из-за одновременного присутствия превителлогенных, вителлогенных, а иногда и зрелых ооцитов в яичнике, можно утверждать, что оогенез у динофилюса асинхронный (Рис. 3А, Рис.4). Во время пролиферативной стадии оогонии и молодые ооциты представляют собой мелкие клетки с крупным ядром, которое занимает большую часть объема клетки, и с малым количеством цитоплазмы, которая окрашивается метиленовым синим в голубой цвет (Рис. 3А). До начала вителлогенеза ооциты сливаются, клеточные границы между ооцитами отсутствуют (Рис. 3В). В результате слияния объем клеток значительно увеличивается (Рис. 3В, С). Цитоплазма образовавшихся клеток гомогенная, без каких либо включений, окрашивается метиленовым синим в яркий насыщенный синий цвет, занимает больший объем клетки. В клетке отчетливо видны ядра слившихся клеток (Рис. 3В). На данных стадиях до начала процесса вителлогенеза отличий между ооцитами не наблюдаются.

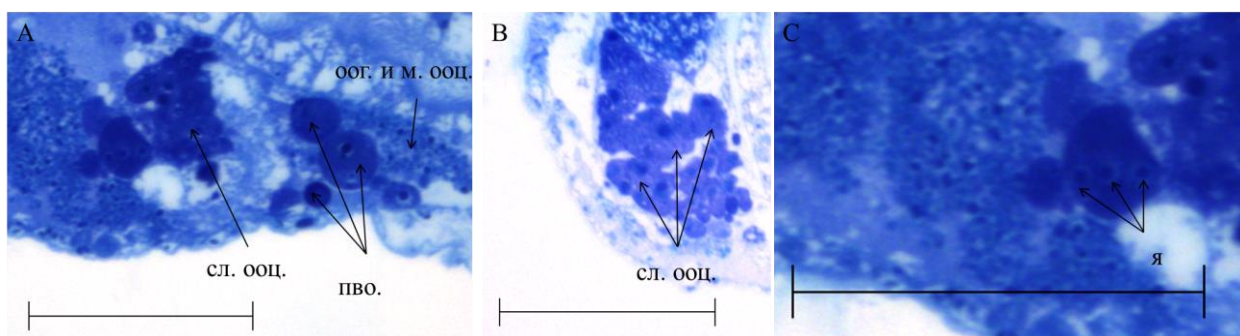


Рисунок 3. Полутонкие срезы через яичник, окраска метиленовым синим.

А – (оог. и м. ооц.) – скопление оогоний и молодых ооцитов, (пво.) – превителлогенный ооцит, (сл. ооц.) – слияние ооцитов. В – слияние ооцитов. С – ооцит, который образовался в результате слияния. Видны ядра (я) слившихся клеток. Масштаб 50 мкм.

В ходе вителлогенеза ооцит увеличивается в объеме и в нем начинается активный синтез гранул желтка в цитоплазме (Рис. 4). Эти гранулы равномерно распределены в цитоплазме. Ооцит на данном этапе имеет округлую форму.

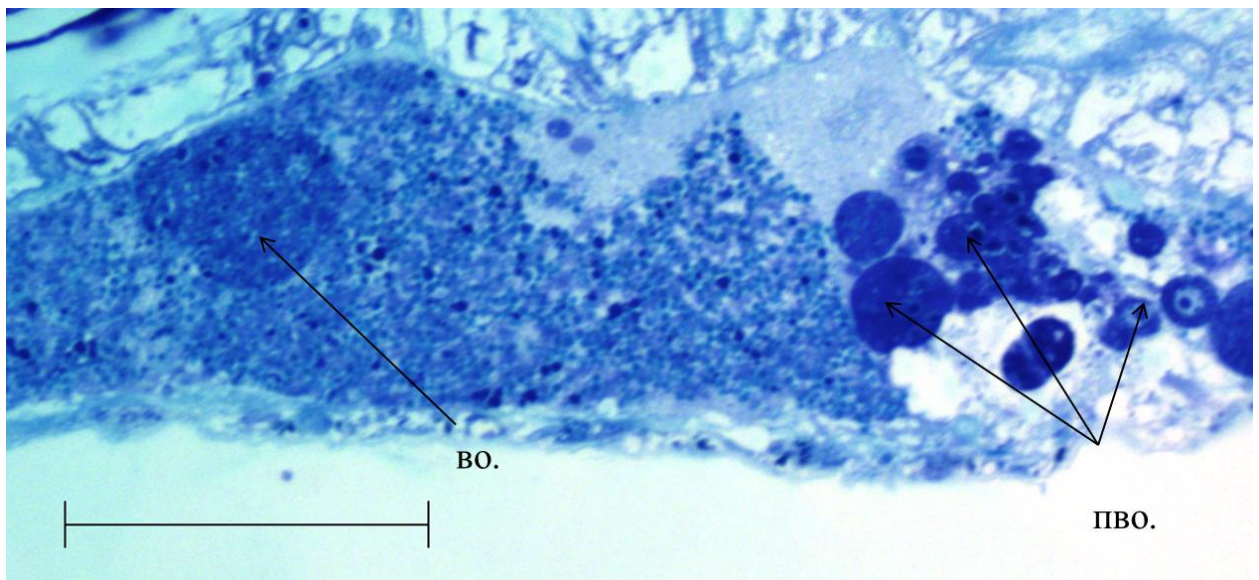


Рисунок 4. Полутонкий срез через яичник, окраска метиленовым синим.

(во.) – вителлогенный ооцит, в котором идет синтез гранул желтка в цитоплазме. (пво.) – превителлогенный ооцит. Масштаб 50 мкм.

Далее в ходе вителлогенеза различия в размерах между ♀ и ♂ ооцитами становятся все более очевидными (Рис 5). На этих этапах в цитоплазме ооцитов появляются крупные вакуоли, число которых увеличивается по мере роста ооцита. В ♀ ооцитах эти вакуоли равномерно заполняют цитоплазму. ♀ ооцит из округлого становится неправильной формы. Ядро ♀ ооцита удалено от центра и лежит ближе к мембране клетки. (Рис. 5А). В то же время в ♂ ооцитах те же вакуоли уже перемещаются на периферию клетки, а ядро ооцита занимает относительно центральное положение (Рис. 5В).

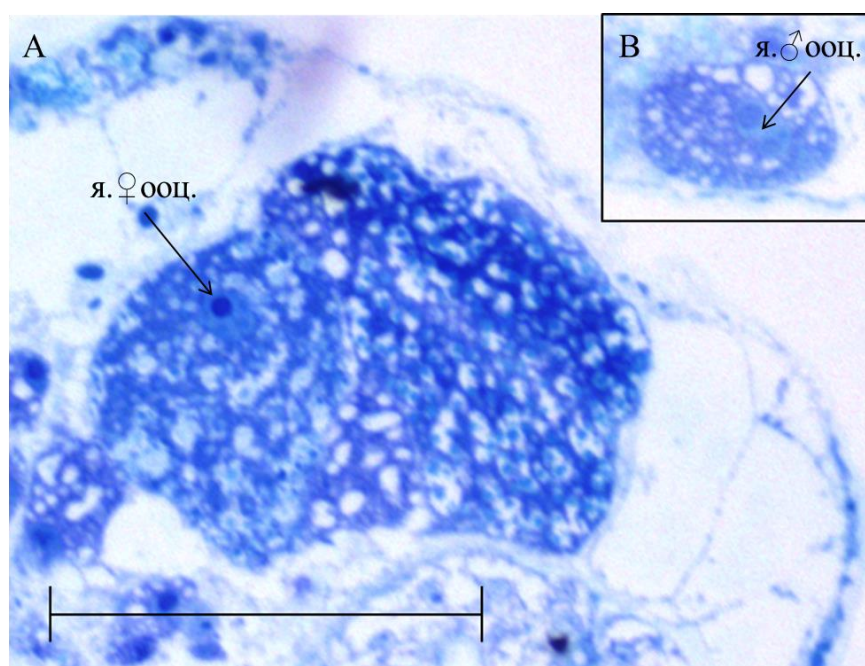


Рисунок 5. Полутонкие срезы через яичник, окраска метиленовым синим.

А – срез через ♀ ооцит. В – срез через ♂ ооцит. (я. ♀ ооц.) – ядро ♀ ооцита, (я. ♂ ооц.) – ядро ♂ ооцита. Масштаб 50 мкм.

По окончании оогенеза отчетливо выделяются два типа яиц: крупный ♀ ооцит и маленький ♂ ооцит (Рис 6). Цитоплазма ооцитов без явных признаков реаранжировки. ♀ ооцит приобрел вытянутую форму, его ядро смещено к периферии клетки к более острому концу. ♂ Ооцит тоже имеет вытянутую форму.

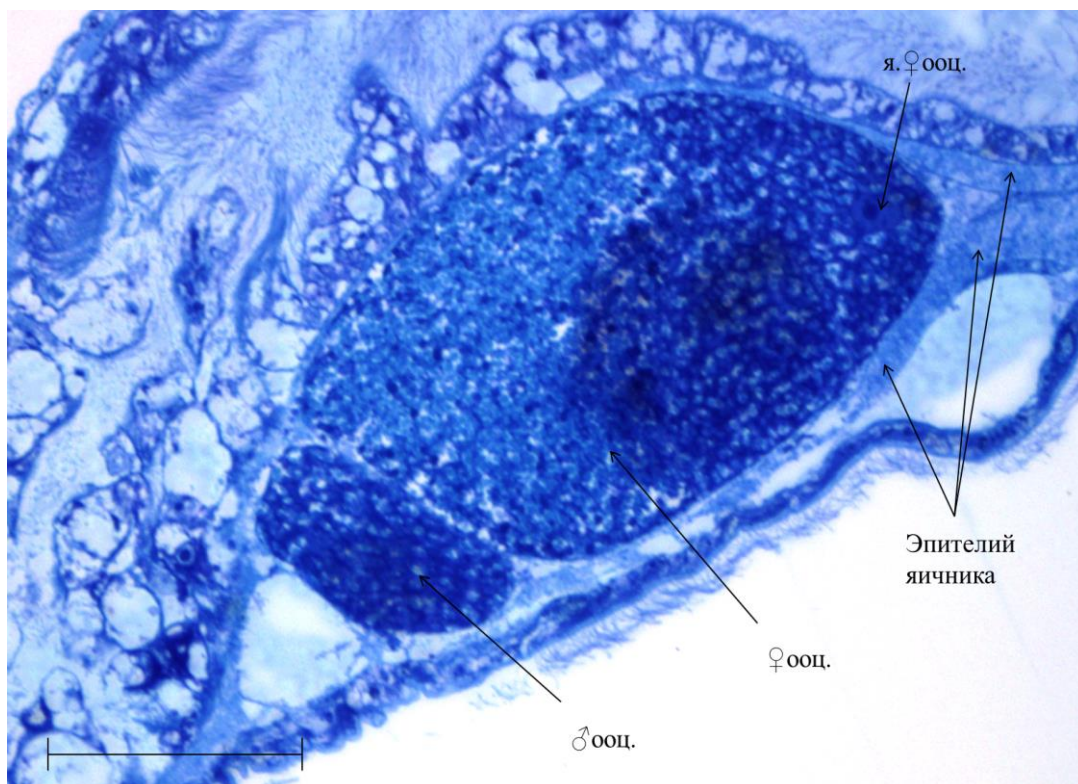


Рисунок 6. Полутонкий срез через яичник, окраска метиленовым синим. (♀ ооц.) – ♀ ооцит, (я. ♀ ооц.) – ядро ♀ ооцита, (♂ ооц.) – ♂ ооцит. Масштаб 50 мкм.

У одного животного было отмечено образование оболочки кокона внутри самки. Ооциты окружены толстым светлым слоем, в который вкраплены относительно крупные гранулы (Рис. 7А). При подробном рассмотрении можно наблюдать картины экзоцитоза гранул у поверхности яйца. Вся эта конструкция окружена мембраной (Рис. 7В). Оболочка не образуется в местах соприкосновения с таким же ооцитом (Рис. 7А, В, С *). Но можно наблюдать то, как сливаются в общий кокон оболочки ооцитов, которые лежат удаленно друг от друга (Рис. 7С).

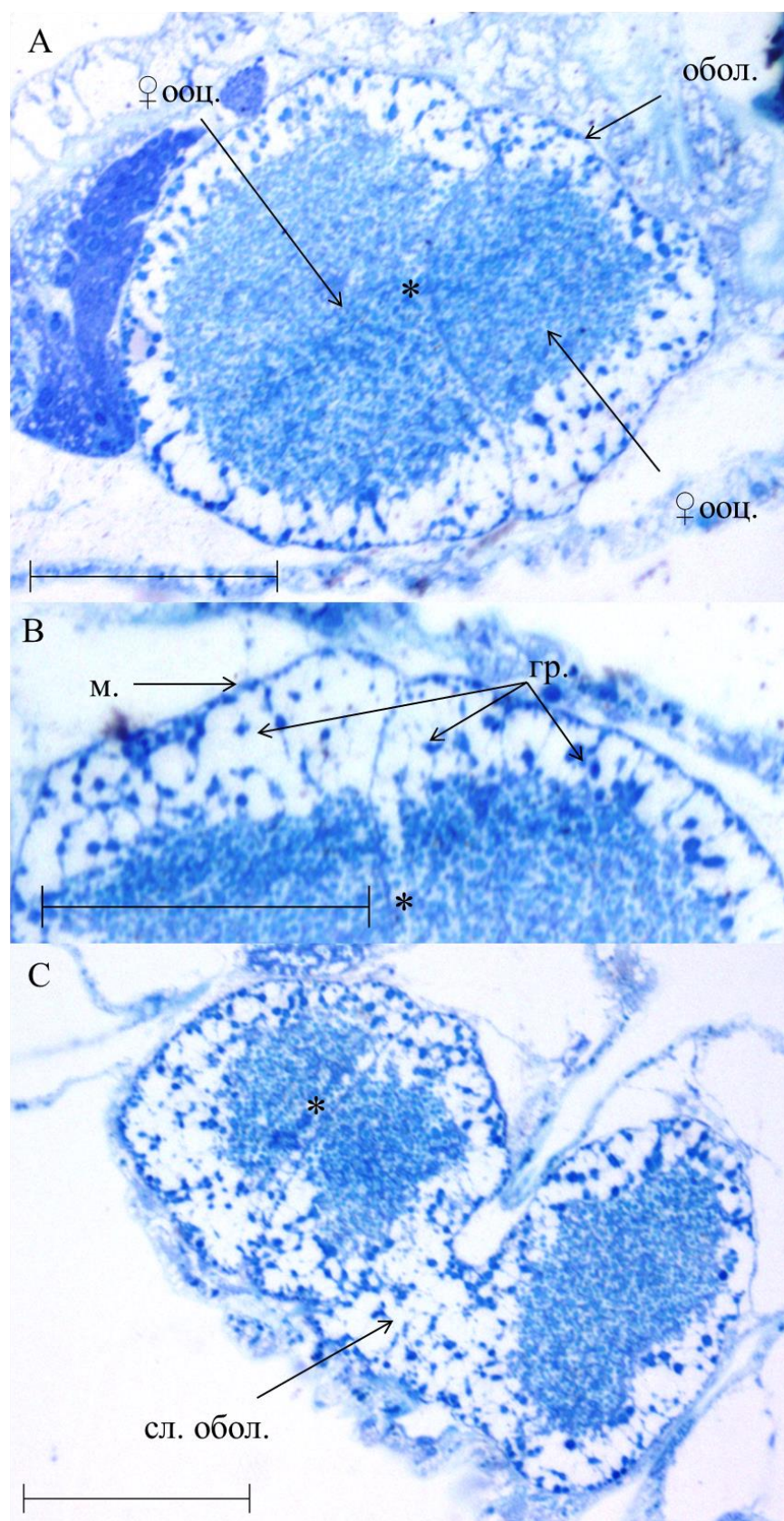


Рисунок 7. Полутонкие срезы через яичник, окраска метиленовым синим.
 А – образование оболочки (обол.) вокруг ♀ ооцитов (♀ ооц.). В – экзоцитоз гранул (гр.). Ооцит окружен мембраной (м.). С – слияние образующихся оболочек ооцитов (сл. обол.). * – место контакта ооцитов. Масштаб 50 мкм.

Интересно отметить то, что если ооцит, в котором происходит экзоцитоз, соприкасается с вителлогенным ооцитом, этот факт не влияет на формирование оболочки в месте контакта (Рис 8).

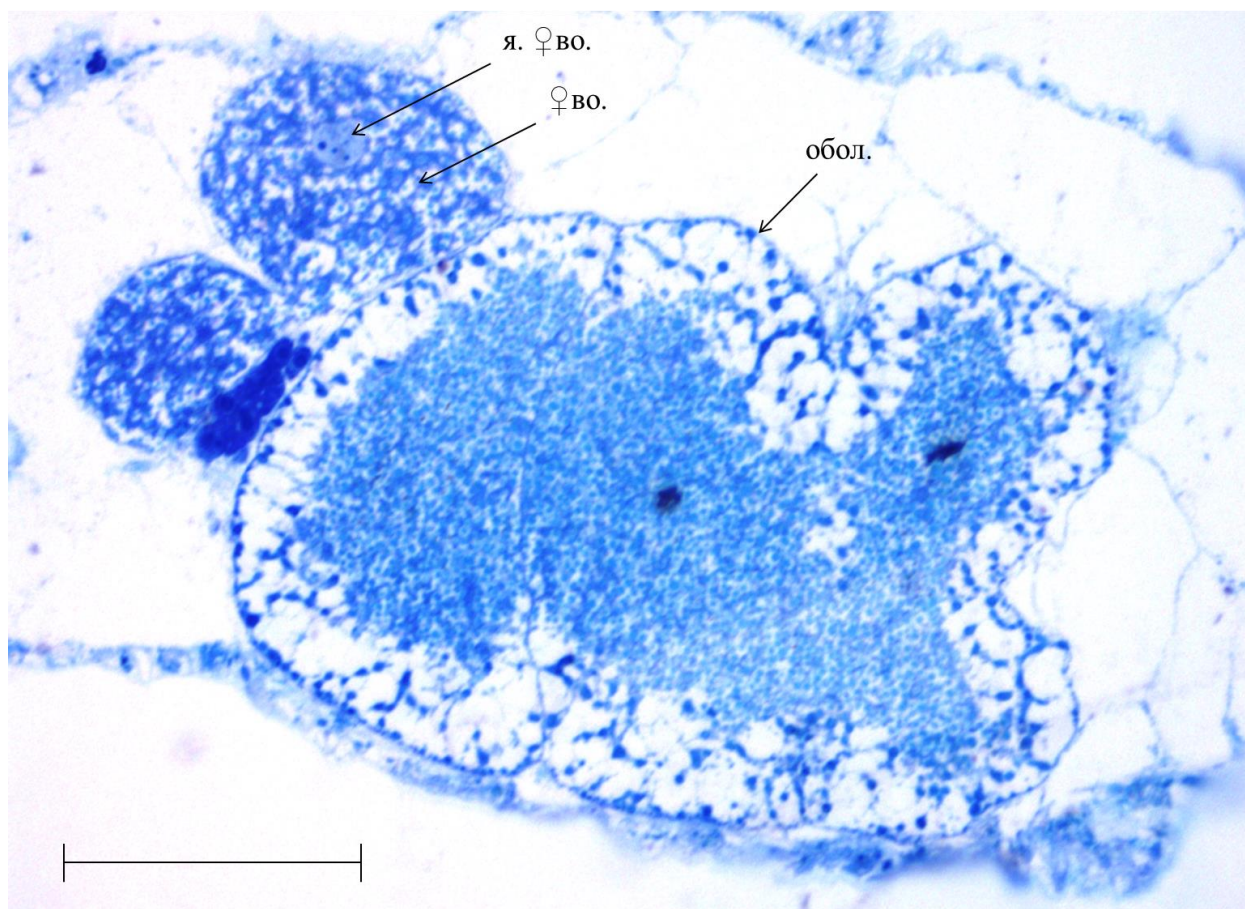


Рисунок 8. Полутонкий срез через яичник, окраска метиленовым синим. Образование оболочки (обол.) в месте контакта с вителлогенным ооцитом (во.). (я. ♀ во.) – ядро вителлогенного ооцита. Масштаб 50 мкм.

Раннее развитие

Самки откладывают коконы с толстыми стенками толщиной 15 микрометров. В коконе находятся два типа яиц: крупные (диаметр – 100-120 микрометров), из которых будут развиваться самки, и мелкие (диаметр – 45-60 микрометров), из которых будут развиваться самцы. Зародыши окружены тонкой желточной оболочкой, которая в одних местах прилегает к зародышу более плотно, чем в других. Сами яйца как правило округлой или овальной формы, в зависимости от того насколько тесно прилежат к другим зародышам (Рис. 9). Цитоплазма клеток непрозрачная, зернистая, пигментированная.

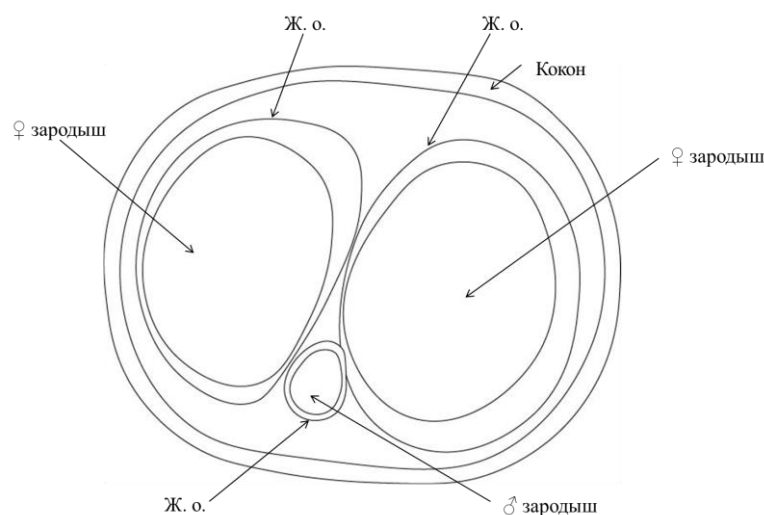


Рисунок 9. Схематическое изображение кокона с зародышами. (Ж.о.) – желточная оболочка.

В коконе может быть от двух до восьми зародышей (самцы включительно). Женских яиц как правила в два раза больше чем мужских, но встречаются и соотношения $3♀:1♂$, $3♀:2♂$, $4♀:1♂$. Количество яиц в коконе зависит от возраста самки, регулярности кормления. Молодые самки откладывают коконы с двумя/тремя зародышами. Взрослые самки при хорошем содержании откладывают крупные коконы с большим количеством зародышей (до восьми). На плодовитость также влияет температура. При 18°C плодовитость больше, чем при 23°C . Световой режим не показал влияния на плодовитость. Самки, которые содержались месяц в темноте, не показали увеличения или снижения плодовитости.

Зародыши в коконе развиваются приблизительно синхронно. Но не обязательно все яйца в коконе будут развиваться до ювильной особи. В коконе может быть одно/несколько яиц, которые не будут развиваться. Бывают коконы, где все яйца «абортивные» (Рис. 10).



Рисунок 10. Прижизненные препараты, DIC. Наблюдение за кокном с «абортивными» яйцами. А – первые сутки, В – четвертые сутки, С – третьи сутки. Масштаб 50 мкм.

С момента откладки кокона до выхода ювенильных особей проходит до 9 суток. Раньше всех из оболочек выходит самец для копуляции с сестрами, после чего вскоре умирает.

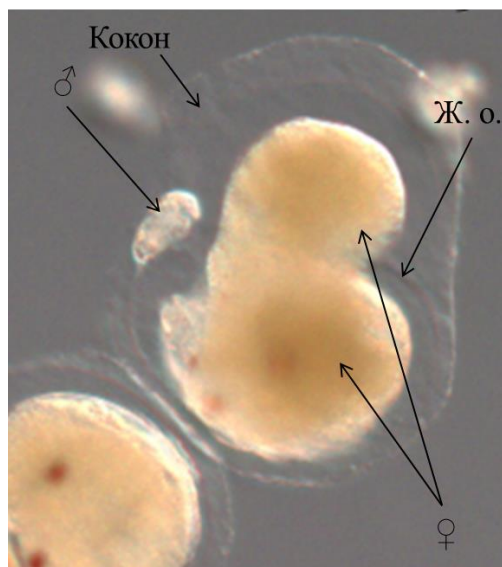


Рисунок 11. Прижизненный препарат, DIC. 9 суток развития. Самец передвигается по желточной оболочке (Ж.о.) самки.

После откладки кокона зародыши еще долго не приступают к делению. Самая ранняя наблюдаемая стадия – яйцеклетка с одним и двумя полярными тельцами (диаметр 7-10 микрометров), которые обозначают анимальный полюс (Рис. 12). Полярные тельца плотно прилегают к поверхности яйца и желточной оболочке (Рис. 12А, В, С). Герминативный пузырек смещен на анимальный полюс (Рис. 12В). Полярные тельца прослеживаются еще на протяжении первых двух делений. Цитоплазма клеток на этих стадиях полностью заполнена многочисленными гранулами желтка округлой формы (Рис.12D). Гранулы приблизительно одинакового размера и равномерно заполняют цитоплазму без явных признаков ооплазматической сегрегации.

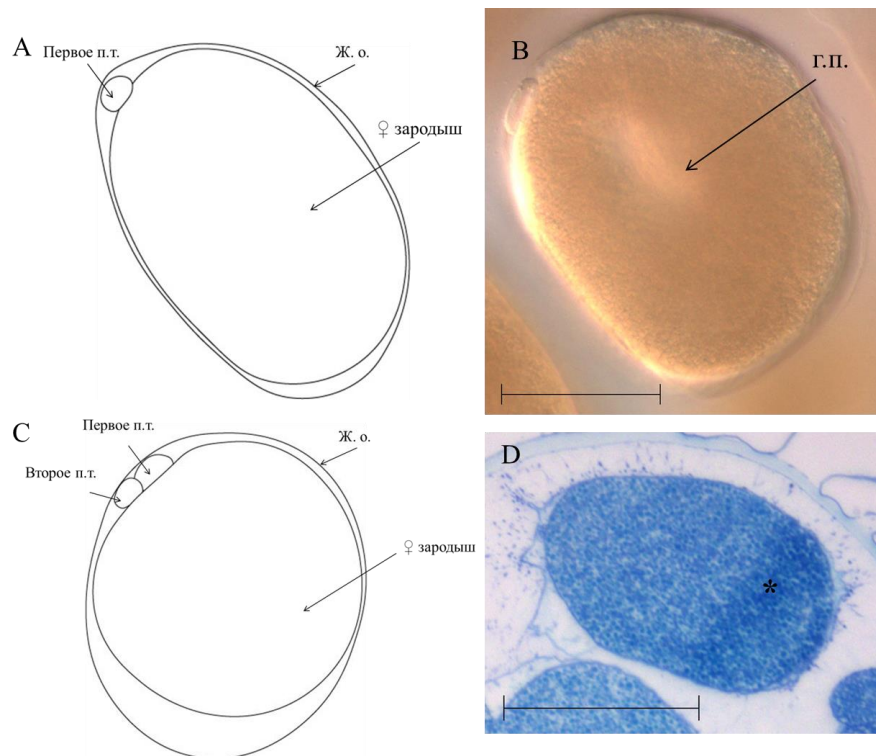


Рисунок 12. Яйцеклетка с одним и двумя полярными тельцами. А – схематическое изображение стадии с одним полярным тельцем, В – прижизненный препарат, DIC, стадия с одним полярным тельцем, (г.п.) – герминативный пузырь, С – схематическое изображение стадии с двумя полярными тельцами, D – полутонкий срез через яйцо до начала дробления. (п.т.) – полярное тельце, (Ж.о.) – желточная оболочка, * – артефакт окрашивания. Масштаб 50 мкм.

Спустя 7-10 часов после откладки кокона начинается первый клеточный цикл. В результате неравного меридионального деления формируются два сильно отличающихся друг от друга бластомера АВ и CD (Рис. 13). Бластомер CD намного больше превышает в размерах бластомер АВ. Полярные тельца поменяли свое положение и теперь лежат над бластомером CD (Рис. 13А).

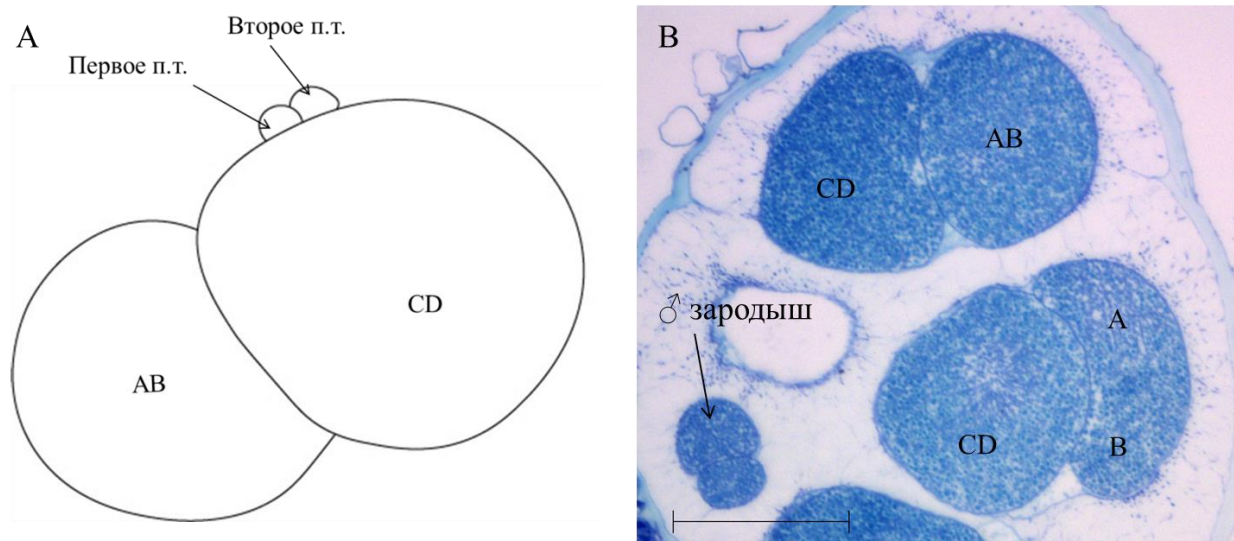


Рисунок 13. Стадия 2-х клеток. А – схематическое изображение зародыша на стадии 2 клеток. (п.т.) – полярное тельце. В – полутонкий срез через кокон с ♀ зародышами на стадии 2 клеток и ♂ зародышем на стадии 2 клеток, окрашивание метиленовым синим. У одного из зародышей бластомер АВ в процессе деления на А и В. В бластомере CD микротрубочки веретена деления собираются в звезду. Масштаб 50 мкм.

Через 3-4 часа после первого деления начинается второе. Бластомеры делятся несинхронно. Первым приступает к делению бластомер АВ (Рис. 13В). Это деление тоже неравномерное. Образующийся бластомер А превышает в размерах бластомер В (Рис. 14А, В). На этой стадии трех клеток зародыш задерживается на какое-то время.

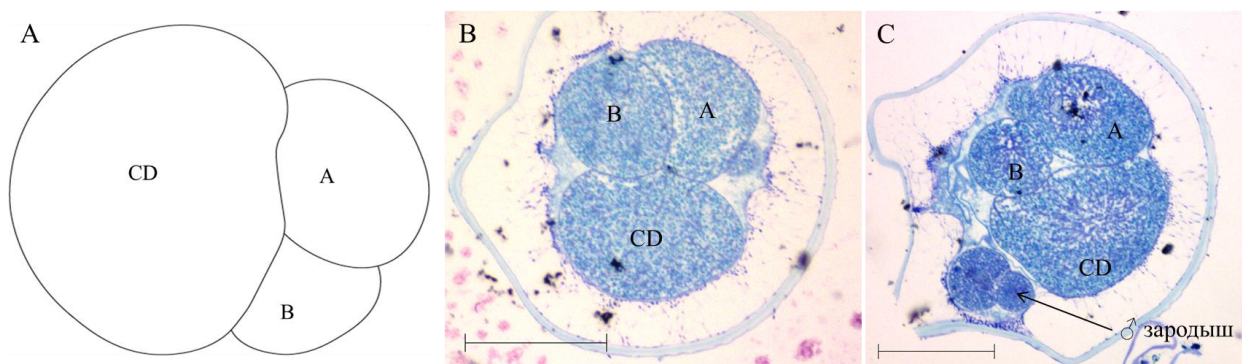


Рисунок 14. Стадия 3-х клеток. А – схематическое изображение зародыша на стадии 3 клеток. В – полутонкий срез через зародыш на стадии 3 клеток, окрашивание метиленовым синим. Масштаб 50 мкм. С – полутонкий срез через кокон с ♀ зародышем на стадии 3 клеток и ♂ зародышем на стадии 2 клеток, окрашивание метиленовым синим. Масштаб 50 мкм. У ♀ зародыша бластомер CD готовится к делению.

Приблизительно через 30 минут после деления АВ начинает делиться CD. В результате этого неравномерного деления образуются гигантский бластомер D и немного меньший C. После завершения второго деления образуется первый квартет бластомеров. Бластомеры сильно отличаются друг от друга по размерам, где D – самый крупный, C – немного меньше, затем A и B – самый маленький. Отчетливо наблюдается полярная спайка между бластомерами A и C на анимальном полюсе. Полярные тельца значительно поменяли свое положение и оттадились друг от друга. Потом они будут фагоцитированы клетками, над которыми лежат.

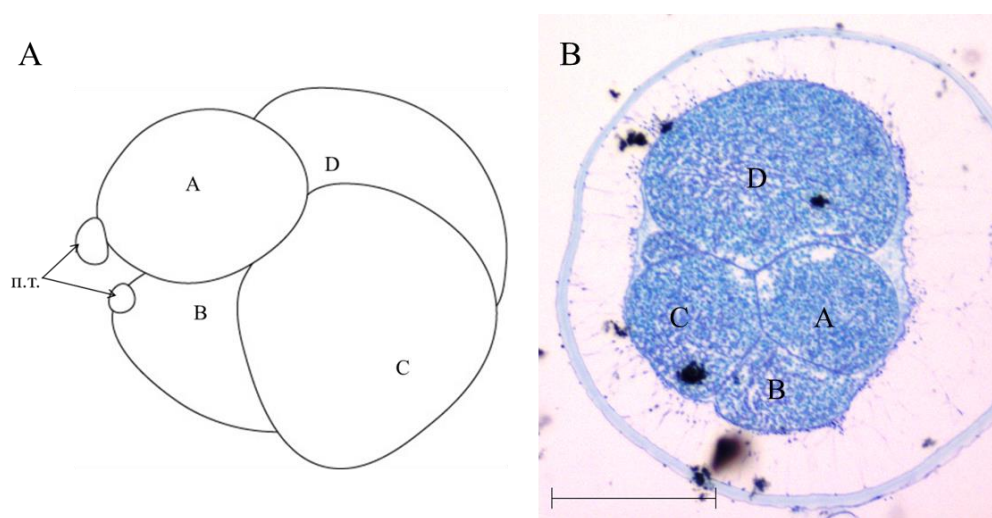


Рисунок 15. Стадия 4-х клеток. А – схематическое изображение зародыша на стадии 3 клеток. Полярные тельца (п.т.) лежат над бластомерами А и В. В – полутонкий срез через зародыш на стадии 4 клеток, окрашивание метиленовым синим. Масштаб 50 мкм.

Приблизительно через 30 минут после второго деления начинается третье. Оно неравномерное и несинхронное, протекает по спиральному типу. Это деление дексиотропное. В результате поворота осей веретён деления под углом к плоскости экватора образующийся квартет микромеров будет смещён по отношению с сестринским макромером по часовой стрелке. Несмотря на то, что D образовался последним, первым к делению приступает именно он. После него делится C, затем A, и последним B. В результате третьего клеточного цикла зародыш состоит из четырех макромеров (1A, 1B, 1C и 1D) и четырех микромеров (1a, 1b, 1c, и 1d). Макромеры – крупные клетки, занимают вегетативный полюс эмбриона. Микромеры уступают по размерам макромерам и располагаются на анимальном полюсе зародыша. Среди микромеров также наблюдается разница в размерах, где 1d – самый крупный, а 1b – самый маленький, 1a немного уступает в размерах 1c (Рис. 16).

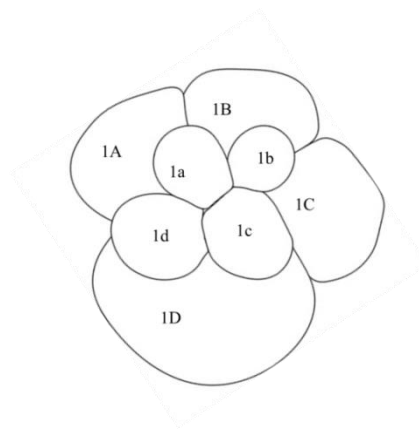


Рисунок 16. Стадия 8 клеток.

Порядок делений D, C, A, B будет сохраняться среди макромеров и их потомков на протяжении следующих пяти делений.

Из-за сильной пигментации цитоплазмы клеток, тесного расположения зародышей в коконе и вследствие этого их измененной форме, проводить дальнейшие прижизненные наблюдения было затруднительно.

Самцы в коконе развиваются примерно параллельно с самками и проходят те же стадии, по крайней мере, на первых двух делениях. Первое деление дробления не равномерное (Рис. 17В). В его результате образуются крупный бластомер CD и намного меньший АВ. Второе деление неравномерное и несинхронное. Первым делится бластомер АВ на А и В. Бластомер В намного меньше А (Рис. 17D). Морфологических признаков ооплазматической сегрегации, реаранжировки доменов цитоплазмы, полярных лопасти на первых этапах дробления не было отмечено.

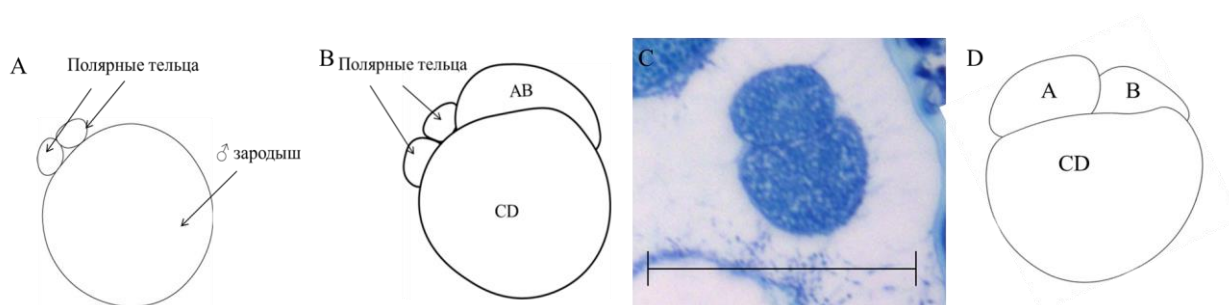


Рисунок 17. Развитие ♂ зародыша. А – ♂ зародыш до начала дробления с двумя полярными тельцами. В – 2-х клеточный ♂ зародыш с полярными тельцами на анимальном полюсе. С – полутонкий срез через 2-х клеточный ♂ зародыш, окрашивание метиленовым синим. Масштаб 50 мкм. D – ♂ зародыш на стадии 3 клеток.

Обсуждение

Формирование оболочки кокона

Для большинства видов полихет характерно не прямое развитие с типичной личинкой – трохофорой. В меньшей степени у полихет представлено прямое развитие (Herbert Wilson, 1991). Такие виды откладывают коконы, в которых происходит эмбриональное развитие. У *Scoloplos armiger* (Orbiniidae: Polychaeta) яйца развиваются в студенистом коконе, материал которого синтезируется железами нефридиальных протоков самки (Anderson, 1959). Самки *Protodrilus adhaerens* (Protodrilidae: Polychaeta) несут пять нерегулярных продольных рядов одноклеточных эпидермальных желез (желез кокона), которые гипертрофируются во время оогенеза и которые, как полагают, ответственны за производство яичной массы (Jägersten, 1952). У Clitellata материал кокона секретируется пояском. В кокон откладывается зигота или гаметы. Развитие в коконе, прямое.

Описывая оогенез динофилюса, Траут писал (Traut, 1970), что оболочка кокона синтезируется самим яйцом при контакте с морской водой. Того же мнения придерживался Грюн (Grün, 1972). Он наблюдал у ооцитов «кортикальную зону». Хотя он предполагал, что наблюдаемая им картина была артефактом пробоподготовки к электронной микроскопии, и что это была оболочка кокона из содержимого мукополисахаридных гранул, которая «протекла».

Учитывая, что мною в отдельных случаях тоже была замечена подобная картина, а протоколы пробоподготовки отличаются по многим пунктам: фиксация, контрастирование, заливка в смолу, можно предположить, что наблюдаемая Грюном картина не была артефактом вовсе. Внутри самки ооциты синтезируют оболочку кокона. Оболочки соседних ооцитов сливаются в общую (Рис. 7С). Таким образом, ооциты оказываются в одном общем коконе с внутренней полостью.

Оплодотворение

Для того чтобы яйцеклетка вышла из стадии первичного ооцита обычно требуется оплодотворение (Иванова-Казас, 1995). У некоторых видов полихет первичный ооцит оплодотворяется во время первой профазы мейоза, когда ядерная мембрана еще сохраняет целостность (Mead, 1898). Для ряда видов отмечена начальная активация яйца, так называемое «предвызревание» (prematuration), которое может произойти до или после нереста. Первичный ооцит в этих формах проходит первую метафазу мейоза до

оплодотворения яйцеклетки, и созревание завершается после проникновения сперматозоида. Дробление начинается после завершения мейоза (Mead, 1898). Это явление наблюдается у *Sabellaria vulgaris* (Waterman, 1934), *Chaetopterus pergamentaceus* (Mead, 1898). У *Sabellaria vulgaris* сигналом к началу процессов предвызревания является контакт с морской водой. Яйцо меняет форму и из неправильной формы становится сферическим. Зародышевый пузырек разрушается, и его содержимое мигрирует на будущий анимальный полюс и формирует гиалиновую шапку. Желточная оболочка приподнимается над поверхностью ооцита, и тонкие цитоплазматические нити тянутся через превителлиновое пространство от мембраны созревающего ооцита до желточной оболочки. Помимо этого, проходит ооплазматическая сегрегация с образованием полярной лопасти (Waterman, 1934). У *Platynereis megalops* оплодотворение внутреннее и не может происходить вне самки (Just, 1914). У олигохет оплодотворение и деления созревания завершаются после откладки кокона. Яйцо в коконе находится в метафазе первого деления созревания.

У *Alitta virens* сразу после оплодотворения происходит кортикальная реакция. Через час после оплодотворения разрушается ядерная оболочка, а через 1,5 часа после оплодотворения образуется веретено первого деления мейоза. А через 2,5-3 часа после оплодотворения выделяется первое полярное тельце (Kostyuchenko and Dondua, 2000).

Если предположить, что у динофилюса оболочка кокона образуется внутри самки в результате экзоцитоза мукополисахаридных гранул, вызываемого вхождением сперматозоида, а самая ранняя наблюдаемая стадия – ооцит с одним полярным тельцем, можно говорить, что оплодотворение происходит непосредственно перед откладкой кокона во внешнюю среду. И уже во внешней среде ооцит проходит дальнейшее деление созревания.

Кортикальная реакция и ооплазматическая сегрегация

У аннелид можно выделить три типа ооплазматической сегрегации яйцеклетки : 1) униполярная, с концентрацией свободной прозрачной цитоплазмы на анимальном полюсе, 2) униполярная, с концентрацией свободной прозрачной цитоплазмы на вегетативном полюсе, 3) биполярная, при которой образуются два цитоплазматических домена на обоих полюсах яйца. Первые два типа характерны для полихет, последний – для поясковых (Shimizu, 1999). У *Sabellaria vulgaris* и *Sabellaria alveolata* ооплазматическая сегрегация проходит с образованием полярной лопасти на вегетативном полюсе зародыша (Waterman, 1934; Speksnijder and Dohmen, 1983).

С приближением нереста в яйцах *Alitta virens* происходит реаранжировка цитоплазматических включений и клеточных органелл. Цистерны аппарата Гольджи смещаются с периферии внутрь яйца. А кортикальные гранулы, распределённые по всей цитоплазме, наоборот движутся к периферии, образуя кортикальную зону цитоплазмы. Липидные капли сливаются в более крупные капли и вместе с гранулами желтка отделяют кортикальную зону от перинуклеарной цитоплазмы (Fischer, Dorresteyn and Hoeger, 1996). Контакт со сперматозоидом запускает ряд важных физиологических и морфологических изменений. После оплодотворения происходит кортикальная реакция, при которой происходит экзоцитоз кортикальных гранул в перивителлиновое пространство (Kostyuchenko and Dondua, 2000). У *Chaetopterus* активация яйцеклетки путем оплодотворения сопровождается ритмическими сокращениями желточной оболочки (Lillie, 1906).

В настоящей работе у *Dinophilus gyrociliatus* на наблюдаемых стадиях морфологических признаков ооплазматической сегрегации не наблюдалось. Цитоплазма клеток на ранних стадиях равномерно заполнена гранулами желтка. Также не выявлено никаких полярных лопастей, протуберанцев и других признаков деления цитоплазмы на домены. Но отсутствие морфологических признаков не означает отсутствие распределения молекулярных доменов в цитоплазме.

В результате кортикальной реакции у динофилюса формируется оболочка кокона. Вхождение сперматозоида в ооцит запускает экзоцитоз мукополисахаридных гранул. Грюн (Grün, 1972) отмечал, что по мере созревания ооцита эти гранулы мигрируют к поверхности клетки. Мною был замечен только результат кортикальной реакции, где уже сформировалась оболочка кокона (Рис 17).

Первые деления

Дробление у *Dinophilus gyrociliatus* идет по спиральному типу. Первые три деления неравномерные, а начиная со второго, становятся асинхронными. Стоит отметить, что обычно у зародышей спиралий синхронность пропадает после четвертого клеточного цикла (Freeman and Lundelius, 1982; Merkel *et al.*, 2012). Наблюдаемый в данной работе и в работе Нельсона (Nelson, 1904) с третьего клеточного цикла порядок делений бластомеров D, C, A, B у динофилюса не уникален. Встречается у *Unio* (Lillie, 1895) и *Arenicola* (Child, 1900). Первое деление дробления может быть равным или неравным. У неравномерно делящихся зародышей больший образующийся бластомер называется CD, а меньший - AB. Это раннее клеточное событие имеет дополнительные важные последствия

для спецификации осей зародыша и D-квадранта. Тот факт, что клетка дающая начало D-квадранту выделяется уже после первого деления, предполагает участие цитоплазматических детерминат (Freeman and Lundelius, 1992). Уникальным можно назвать такие продолжительные клеточные циклы. Если динофилюс только через 7-10 часов после откладки приступает к первому делению, то, например, зародыш *Alitta virens* на момент 8 часов после оплодотворения состоит из 4 клеток (Костюченко and Дондуа, 2006). Увеличение продолжительности эмбрионального развития можно связать с переходом к прямому развитию.

В настоящей работе удалось пролить свет на некоторые важные особенности раннего развития. Но отдельные вопросы остаются еще не решенными до конца. Применение морфологических методов исследования оказывается недостаточным для их решения. И для дальнейших исследований требуется применение методов молекулярной биологии. Например, прижизненное наблюдение с помощью конфокальной микроскопии с витальным окрашиванием зародышей позволило бы получить четкие картины геометрии и порядка деления клеток, которые, к сожалению не достижимы методами световой оптики. А изучив распределение, например, мРНК или лигандов сигнальных путей в яйцеклетках и зародышах, получилось бы точнее описать процессы цитоплазматической сегрегации.

Выводы

1. Оболочка кокона у *Dinophilus gyrociliatus* формируется в результате кортикальной реакции на вхождение сперматозоида.
2. Оплодотворение внутренне, происходит непосредственно перед откладкой кокона. Дальнейшее созревание ооциты проходят после откладки во внешней среде.
3. Морфологических признаков ооплазматической сегрегации в ходе созревания ооцита и первых трех делений дробления не отмечено.
4. Спиральное дробление зародышей *Dinophilus gyrociliatus* характеризуется нетипичной для данного типа дробления ранней асинхронностью, начиная со второго клеточного цикла.

Список литературы

1. Беклемишев, В. . (1964) *Основы сравнительной анатомии беспозвоночных, Т1*. М.: Наука.
2. Иванов, П. П. (1937) *Общая и сравнительная эмбриология*. М. -Л: Биомедгиз.
3. Иванова-Казас, О. М. (1995) *Эволюционная эмбриология животных*. Санкт-Петербург: Наука.
4. Костюченко, Р. П. and Дондуа, А. К. (2006) 'Закономерности формирования прототроха в эмбриональном развитии полихеты *Nereis virens*', *Онтогенез*, 37(2), pp. 91–99.
5. Agassiz, A. (1867) 'On the Young Stages of a few Annelids', *The Annals and magazine of natural history; zoology, botany, and geology being a continuation of the Annals combined with Loudon and Charlesworth's Magazine of Natural History*.
6. Anderson, D. T. (1959) 'The embryology of the polychaete *Scoloplos armiger*', *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 100(March), pp. 89–166.
7. Anderson, D. T. (Donald T. (1973) *Embryology and phylogeny in annelids and arthropods*. Pergamon Press.
8. Andrade, S. C. S. *et al.* (2015) 'Articulating "Archannelids": Phylogenomics and annelid relationships, with emphasis on meiofaunal taxa', *Molecular Biology and Evolution*, 32(11), pp. 2860–2875.
9. Balavoine, G. (2014) 'Segment formation in annelids: Patterns, processes and evolution', *International Journal of Developmental Biology*, 58(6–8), pp. 469–483.
10. Child, C. M. (1900) 'The early development of *Arenicola* and *Sternaspis*', *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*. Springer-Verlag, 9(4), pp. 587–723.
11. Conklin, E. G. (1897) 'The embryology of *crepidula*, A contribution to the cell lineage and early development of some marine gasteropods', *Journal of Morphology*. Wiley-Blackwell, 13(1), pp. 1–226.
12. Dixon, D. R., Pascoe, P. L. and Dixon, L. R. J. (1998) 'Karyotypic Differences Between Two Species of *Pomatoceros*, *P. Triqueter* and *P. Lamarckii* (Polychaeta: Serpulidae)', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Cambridge University Press, 78(4), pp. 1113–1126.

13. Fauvel, P. (1927) 'Faune De France. 16. POLYCHÈTES SÉDENTAIRES', p. 207.
14. Fischer, A., Dorresteyn, A. W. C. and Hoeger, U. (1996) 'Metabolism of oocyte construction and the generation of histospecificity in the cleaving egg. Lessons from nereid annelids', *International Journal of Developmental Biology*, 40(1), pp. 421–430.
15. Fofanova, E. G., Nezlin, L. P. and Voronezhskaya, E. E. (2014) 'Ciliary and nervous structures in juvenile females of the annelid *Dinophilus gyrotilatus* (O. Schmidt, 1848) (Annelida: Polychaeta)', *Russian Journal of Marine Biology*, 40(1), pp. 43–52.
16. Freeman, G. and Lundelius, J. W. (1982) 'The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Lymnaea peregra*', *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. Springer-Verlag, 191(2), pp. 69–83.
17. Freeman, G. and Lundelius, J. W. (1992) 'Evolutionary implications of the mode of D quadrant specification in coelomates with spiral cleavage', *Journal of Evolutionary Biology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 5(2), pp. 205–247.
18. Gambi, M. C. *et al.* (1997) 'Variation in Genome Size in Benthic Polychaetes: Systematic and Ecological Relationships', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Cambridge University Press, 77(4), pp. 1045–1057.
19. Giangrande, A. and Gambi, M. C. (1998) 'Metamerism and life - style within polychaetes : Morpho - functional aspects and evolutionary implications Metamerism and life-style within polychaetes : morpho-functional', *Italian Journal of Zoology*, 65(April 2014), pp. 39–50.
20. Grün, G. (1972) 'Über den Eidimorphismus und die Oogenese von *Dinophilus gyrotilatus* (Archiannelida)', *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. Springer-Verlag, 130(1), pp. 70–92.
21. Herbert Wilson, W. (1991) 'Sexual reproductive modes in polychaetes: classification and diversity', *Bulletin of Marine Science*, 48(2), pp. 500–516.
22. Hermans, C. O. (1969) 'The Systematic Position of the Archiannelida', *Systematic Biology*. Narnia, 18(1), pp. 85–102.
23. Ivanov, P. P. (1928) 'Die Entwicklung der Laralsegmente bei den Anneliden', *Z. Morph. Ökol. Tiere*, 10, pp. 62–161.
24. Jägersten, G. (1951) 'Life Cycle of *Dinophilus*, with Special Reference to the Encystment and

- Its Dependence on Temperature', *Oikos*, 3, pp. 143–165.
25. Jägersten, G. (1952) *Studies on the morphology, larval development and biology of Protodrilus*. Almqvist & Wiksells.
 26. Just, E. E. (1914) 'Breeding habits of the heteronereis form of *Platynereis megalops* at Woods Hole, Mass.', *The Biological Bulletin*, 27(4), pp. 201–212.
 27. Kerbl, A. *et al.* (2016) 'Comparison of neuromuscular development in two dinophilid species (Annelida) suggests progenetic origin of *Dinophilus gyrotilatus*', *Frontiers in Zoology*. *Frontiers in Zoology*, 13(1), p. 49.
 28. Kerbl, A. *et al.* (2017) 'High diversity in neuropeptide immunoreactivity patterns among three closely related species of Dinophilidae (Annelida)', *Journal of Comparative Neurology*. Wiley-Blackwell, 525(17), pp. 3596–3635.
 29. Korschelt, E. (1882) 'Über Bau und Entwicklung von *Dinophilus apatris*', *Z. wiss. Zool.*, 37, pp. 315–353.
 30. Kostyuchenko, R. P. and Dondua, A. K. (2000) 'Ooplasmic segregation and axis formation in the polychaete *Nereis virens* embryo', *Russian Journal of Developmental Biology*, 31(2), pp. 95–105.
 31. Lillie, F. R. (1895) 'The embryology of the Unionidae. A study in cell-lineage', *Journal of Morphology*. John Wiley & Sons, Ltd, 10(1), pp. 1–100.
 32. Lillie, F. R. (1906) 'Observations and experiments concerning the elementary phenomena of embryonic development in *Chaetopterus*', *Journal of Experimental Zoology*. John Wiley & Sons, Ltd, 3(2), pp. 153–268.
 33. Martin, F. and Traut, W. (1987) 'The Mode of Sex Determination in *Dinophilus gyrotilatus* (Archiannelida)', *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*. Taylor & Francis Group, 11(2), pp. 159–171.
 34. Mead, A. D. (1898) 'The rate of cell-division and the function of the centrosome'.
 35. Mecnikow, E. (1866) 'Apsilus lentiformis, ein Räderthier', *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, XVI.
 36. Merkel, J. *et al.* (2012) 'Spiral cleavage and early embryology of a loxosomatid entoproct and the usefulness of spiralian apical cross patterns for phylogenetic inferences', *BMC*

Developmental Biology. BioMed Central, 12(1), p. 11.

37. Müller, M. C. M. and Westheide, W. (2002) 'Comparative analysis of the nervous systems in presumptive progenetic dinophilid and dorvilleid polychaetes (Annelida) by immunohistochemistry and cLSM', *Acta Zoologica*, 83(1), pp. 33–48.
38. Nachtsheim, H. (1919) 'Zytologische und experimentelle Untersuchungen über die Geschlechtsbestimmung bei *Dinophilus apatris* Korsch', *Archiv für Mikroskopische Anatomie*. Springer-Verlag, 93(1–2), pp. A17–A140.
39. Nelson, J. A. (1904) 'The early development of *Dinophilus*: A study in cell-lineage', *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 56(3), pp. 687–737.
40. Prevedelli, D. and Simonini, R. (2003) 'Life cycles in brackish habitats : adaptive strategies of some polychaetes from the Venice lagoon Cycles vitaux dans des habitats saumâtres : stratégies adaptatives de quelques polychètes dans la lagune de Venise', *Oceanologica Acta*, 26, pp. 77–84.
41. Sato, M. and Ikeda, M. (1992) 'Chromosomal complements of two forms of *Neanthes japonica* (Polychaeta, Nereididae) with evidence of male-heterogametic sex chromosomes', *Marine Biology*. Springer-Verlag, 112(2), pp. 299–307.
42. Schimkewitsch, W. (1895) 'Zur Kenntnis des Baues und der Entwicklung des *Dinophilus* von Weissen Meere', *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*.
43. Schmarda, L. K. (1861) *Neue wirbellose thiere beobachtet und gesammelt auf einer reise um die erde 1853 bis 1857*. Leipzig : W. Engelmann,.
44. Schmidt, E. O. (1848) *Neue Beiträge zur Naturgeschichte der Würmer gesammelt auf einer Reise nach den Faerör im Frühjahr 1848*. Frd. Mauke.
45. Schmidt, O. (1857) 'Sitzung vom 5. Februar 1857. Eingesendete Abhandlung. Zur Kenntniss der Turbellaria rhabdocoela und einiger anderer Würmer des Mittelmeeres', *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe.*, 23, pp. 347–366.
46. Sella, G. *et al.* (1995) 'Chromosomal nucleolar organizer region (NOR) phenotypes in nine species of the genus *Ophryotrocha* (Polychaeta: Dorvilleidae)', *Marine Biology*. Springer-Verlag, 124(3), pp. 425–433.
47. Shearer, C. (1911) 'The Problem of Sex Determination in *Dinophilus gyrotilatus*', *Journal of*

- the Marine Biological Association of the United Kingdom*. Cambridge University Press, 9(02), p. 156.
48. Shimizu, T. (1999) 'Cytoskeletal mechanisms of ooplasmic segregation in annelid eggs', *International Journal of Developmental Biology*, 43(1), pp. 11–18.
 49. Simonini, R. *et al.* (2003) 'Karyotype and sex determination in *Dinophilus gyrotilatus* (Polychaeta: Dinophilidae)', *Marine Biology*. Springer-Verlag, 142(3), pp. 441–445.
 50. Speksnijder, J. E. and Dohmen, M. R. (1983) 'Local surface modulation correlated with ooplasmic segregation in eggs of *Sabellaria alveolata* (annelida, polychaeta)', *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. Springer-Verlag, 192(5), pp. 248–255.
 51. Struck, T. H. (2006) 'Progenetic species in polychaetes (Annelida) and problems assessing their phylogenetic affiliation', 46(4), pp. 558–568.
 52. Struck, T. H. *et al.* (2015) 'The Evolution of Annelids Reveals Two Adaptive Routes to the Interstitial Realm', *Current Biology*, 25(15), pp. 1993–1999.
 53. Traut, W. (1969a) 'Zur Sexualität von *Dinophilus gyrotilatus* (Archiannelida). I. Der Einfluß von Außenbedingungen und genetischen Faktoren auf das Geschlechtsverhältnis', *Biol. Zbl.*, 88, pp. 469–495.
 54. Traut, W. (1969b) 'Zur Sexualität von *Dinophilus gyrotilatus* (Archiannelida). II. Der Aufbau des Ovars und die Oogenese', *Biol. Zbl.*, 88, pp. 695–714.
 55. Traut, W. (1970) 'Zur Sexualität von *Dinophilus gyrotilatus* (Archiannelida). III. Die Geschlechtsbestimmung', *Biol. Zbl.*, 89, pp. 137–161.
 56. Tzonis, K. (1938) 'Beeinflussung der Geschlechtsverhältnisse bei *Dinophilus apatris* Korsch. durch Außenbedingungen', *Zool Jb*, 58, pp. 433–574.
 57. Waterman, A. J. (1934) 'Observations on Reproduction, Prematuration, and Fertilization in *Sabellaria vulgaris*', *The Biological Bulletin*. Marine Biological Laboratory, 67(1), pp. 97–114.
 58. Weldon, W. F. R. (1886) 'On *Dinophilus gigas*', *Quarterly Journal of Microscopical Science*.
 59. Westheide, W. (1985) 'The systematic position of the Dinophilidae and the archiannelid problem', *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*, pp. 310–326.
 60. Westheide, W. (1987) 'Progenesis as a principle in meiofauna evolution', *Journal of Natural*

History. Taylor & Francis Group , 21(4), pp. 843–854.

61. Westheide, W. (1990) ‘No Title’, *Polychaetes: Interstitial families*, 44, pp. 1–153.

62. Wolff, C. and Hilbrant, M. (2011) ‘The embryonic development of the central American wandering spider *Cupiennius salei*’, *Frontiers in Zoology*, 8(15), pp. 1–34.